



Title	Purification and properties of extracellular mutacin, a bacteriocin from Streptococcus sobrinus
Author(s)	Juan, Pablo Loyola Rodriguez
Citation	大阪大学, 1992, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/38043
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

【5】

氏 名	フアン パブロ ロヨラ ロドリゲス Juan Pablo Loyola Rodriguez
博士の専攻分野の名称	博 士 (歯 学)
学位記番号	第 1 0 2 1 8 号
学位授与年月日	平成 4 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 歯学研究科 歯学基礎系専攻
学位論文名	Purification and properties of extracellular mutacin, a bacteriocin from <i>Streptococcus sobrinus</i> (<i>Streptococcus sobrinus</i> の菌体外バクテリオシン [ミュータシン] の精製と性状)
論文審査委員	(主査) 教 授 浜田 茂幸 (副査) 教 授 祖父江鎮雄 助教授 滝川 正春 講師 三木 靖夫

論 文 内 容 の 要 旨

(目 的)

バクテリオシンは細菌が産生する抗菌性のポリペプチドである。典型的なバクテリオシンはグラム陰性菌により産生され、同種あるいは近縁の菌種に対して抗菌作用を示す。これに対して、ミュータンスレンサ球菌の臨床分離株の多くが、広い抗菌スペクトルを持つバクテリオシン様物質を産生することがいくつかの方法により示されている。この抗菌物質はミュータシンと総称され、口腔フローラ中におけるミュータシンの生態学的意義の解明は重要な研究課題の 1 つと考えられる。

Kitamura ら (1989) は、本学小児歯科の外来患児から分離したミュータシン産生株 *Streptococcus sobrinus* MT 6223 株 (血清型 *g*) が、同菌の産生するミュータシン感受性の *Streptococcus mutans* MT 8148R 株 (血清型 *c*) の定着を阻止することをラットを用いた *in vivo* 実験で示した。ミュータシン活性は寒天平板培地に穿刺培養を行った場合にのみ認められることが圧倒的に多いが、*S. sobrinus* MT 6223 株は液体培養で菌体外にミュータシンを遊離する例外的な菌株である。本研究は、同ミュータシンを分離精製し、その性状を明らかにしようと試みたものである。

(方 法)

ミュータシン産生株として *S. sobrinus* MT 6223 株を用い、指示菌としては血清型 *a-h* に属するミュータンスレンサ球菌株を用いた。本研究で用いたミュータシン MT 6223 は、MT 6223 株を TTY 培地透析外液で培養後、硫酸沈澱、クロマトフォーカシング、SP-Sephadex C-25 カラムクロマトグラフィーにより純化して得た。精製ミュータシンの熱安定性を調べるため、ミュータシン MT 6223 を 37℃、60℃、80℃で各 1 時間、100℃で 20 分間、120℃で 5 分間あるいは 20 分間処理した。pH 安定性は pH 2-11 の各種

のバッファー中に2時間静置し、ミュータシン活性を調べた。また、ミュータシンを種々の酵素で処理し、それらの影響を調べた。感受性菌によるDNA, RNA, たんぱく質の生合成に及ぼす精製ミュータシンの影響は、それぞれの合成前駆物質である $[^3\text{H}]$ チミジン, $[^3\text{H}]$ ウラシル, $[^3\text{H}]$ L-グルタミン酸の、指示菌 *S. mutans* MT8148R株(血清型c)へのとり込みによって測定した。ミュータシンの抗う蝕作用は、*S. mutans* MT8148Rを感染したSPF Fischer ラットに高スクロース食を投与し、かつミュータシン MT 6223を飲料水と共に与え、55日間飼育後のう蝕スコアを非ミュータシン投与群と比較した。(結果と考察)

S. sobrinus MT 6223 株の培養上清の60%硫酸濃縮物を、PBE 94 を用いたクロマトフォーカシングを行うことにより、ミュータシン活性はグルコシルトランスフェラーゼやリボタイコ酸などと分離された。さらに抗菌作用発現活性画分をSP-Sephadex C-25カラムによりクロマトグラフィーを行うと、SDS-PAGEで分子量6,500の単一バンドを与えることが示された。泳動ゲルを洗浄後、ゲル上に指示菌を含む軟寒天培地を重ねると、上記タンパクバンドの位置に生育阻止円が出現した。このことは6.5 kDa タンパクが活性ミュータシンであることを示すものである。ミュータシン活性はpH 2-8, あるいは100 °C, 20分間加熱処理を行っても安定であるが、パパインやフィシン消化により活性を失った。また精製ミュータシンは*S. mutans* (血清型c/e/f) の菌株には抗菌性を示すが、*S. sobrinus* 株は感受性を示さなかった。*S. mutans* MT 8148R 株の生育細胞に同ミュータシン (≥ 10 AU/ml) を添加すると同菌の生育は抑制され、25 AU/ml以上では $[^3\text{H}]$ ラベル前駆物質の取り込みを指標にしたDNA, RNA, およびタンパク質の合成が阻害された。一方、*in vivo* では*S. mutans* MT 8148R 株感染ラットのう蝕の発生が、精製ミュータシン MT6223 (50-100 AU/ml) 添加飲料水を摂取させることにより統計学的に有意に現象した。う蝕の抑制率と歯面の*S. mutans* の生息数の低下はミュータシンの添加量の増加とともに、より顕著なものとなった。これらの結果は、ミュータシンが口腔フローラの重要な修飾因子として機能していることを強く示唆している。また、ミュータシン MT 6223は適切な投与方法を採れば、う蝕抑制剤としての応用価値があると考えらる。

論文審査の結果の要旨

本研究は、*Streptococcus sobrinus* MT 6223株の産生する菌体遊離型のバクテリオシン(ミュータシン MT 6223)をクロマトグラフィーにより精製純化し、その性状を明らかにしたものである。ミュータシン MT 6223はSDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動の結果から分子量6,500と算出された。同ミュータシンはパパインやフィシンの酵素作用により失活するが、熱やpHに安定なペプチド性物質と同定された。同ミュータシンは血清型c/e/fの*Streptococcus mutans*に強い抗菌作用を示した。またミュータシンを飲料水を添加することにより、*S. mutans* 感染 Fischer ラットのう蝕発生が有意に抑制された。

S. sobrinus 由来のバクテリオシンの純化とその性状を明らかにした研究はこれまでになく、本研究は博士(歯学)の学位請求に値する業績であると認める。